



OOPIUMUNIKKO (PAPAVER
SOMNIFERUM) - BENTSYYLI-
ISOKINOLISTEN ALKALOIDIEN
BIOSYNTTEESI JA MERKITYS

Elli Koukkari



7. HELMIKUUTA 2022
OULUN YLIOPISTO

Sisällys

| | | |
|-----|---|----|
| 1. | Tiivistelmä..... | 2 |
| 2. | Johdanto..... | 3 |
| 3. | Bentsyyli-isokinolisten alkaloidien biosynteesi | 4 |
| 3.1 | (S)-retikuliini..... | 6 |
| 3.2 | Morfiini..... | 7 |
| 3.3 | Papaveriini | 8 |
| 3.4 | Magnofloriini..... | 10 |
| 3.5 | Sanguinariini..... | 10 |
| 3.6 | Noskapiini | 11 |
| 3.7 | Bentsyyli-isokinolisten alkaloidien biosynteesi ja kuljetus kasvisolussa..... | 11 |
| 3.8 | Bentsyyli-isokinolisten alkaloidien biosynteesin sijainti ja alkaloidien kuljetus kasvisolukoissa | 13 |
| 4. | Biosynteesin säätely..... | 14 |
| 4.1 | Transkriptiofaktorit..... | 14 |
| 4.2 | Hormonaalinen säätely | 15 |
| 4.3 | Endofyytit..... | 16 |
| 4.4 | MiRNA | 17 |
| 4.5 | Ympäristön vaikutus alkaloidien biosynteesiin | 18 |
| 5. | Bentsyyli-isokinolisten alkaloidien merkitys puolustuksessa..... | 19 |
| 5.1 | Bentsyyli-isokinolisten alkaloidien vaikutus kasvinsyöjiin..... | 19 |
| 5.2 | Bentsyyli-isokinolisten alkaloidien vaikutus mikrobeihin..... | 20 |
| 6. | Pohdinta..... | 20 |
| 7. | Lähteet..... | 22 |

1. Tiivistelmä

Oopiumunikko (*Papaver somniferum*) on kaksisirkainen yksivuotinen kukkakasvi, jota on viljelty pitkään sen tuottamien sekundäärimetaboliittien vuoksi. Sekundäärimetaboliitit ovat yhdisteitä, jotka eivät ole välttämättömiä kasville, mutta parantavat kasvin sietokykyä abioottisia ja bioottisia stressitekijöitä vastaan. Oopiumunikosta saatavat taloudellisesti ja lääketieteellisesti tärkeimmät sekundäärimetaboliitit ovat morfiini, kodeiini ja tebaiini, jotka kuuluvat bentsyyli-isokinolisiin alkaloideihin. Muita oopiumunikossa yleisiä alkaloidia ovat papaveriini, noskapiini, sanguinariini ja magnofloriini.

Yleisimpien bentsyyli-isokinolisten alkaloidien (BIA) biosynteesi oopiumunikossa alkaa kahden L-tyrosiinijohdannaisen kondensaatiolla. Näiden yhdisteiden biosynteesi reitti on monivaiheinen, ja siihen osallistuvat kymmenet eri entsyymit. Vain sanguinariinin solunsisäisestä biosynteesipaikasta ja kuljetuksesta on esitetty hypoteettinen malli. Bentsyyli-isokinolisten alkaloidien biosynteesiin osallistuvat kolme eri nilan solukkotyyppiä: seurasolut, siiviläelementit ja maitiaisputket.

Biosynteesiä säätelevät monet eri tekijät, kuten transkriptiofaktorit, kasvihormonit, endofyytit sekä miRNA-molekyylit. Oopiumunikosta löydetty WRKY-, MYB- sekä mahdollisesti CH3-transkriptiofaktorit osallistuvat esimerkiksi biosynteesissä vaikuttavien geenien ekspressioon. Kasvihormoneja ja heräteaineita (elicitor) hyödynnetään sekundäärimetabolian tutkimisessa. Esimerkiksi kasvien käsittely metyylijasmonaatilla, gibberilliinihapolla sekä n-triakontanolilla lisäsi yleisimpien BIA:en kertymistä oopiumunikossa. Alkaloidien määrää lisäävät myös oopiumunikon endofyyttiset mikrobit, jotka vaikuttavat solukkospesifisesti BIA-biosynteesissä olennaisten geenien ekspressioon. Lisäksi miRNA-molekyylit osallistuvat solukkospesifisesti BIA-biosynteesiin postranskriptionaalisesti ja niiden avulla voisi mahdollisesti lisätä kasvin BIA-pitoisuutta. Edellä mainittujen säätelytekijöiden tarkkaa mekanismia BIA-biosynteesireitillä ei vielä tunneta tarkasti.

Oopiumunikosta erittyvä maitiaisneste ja sen sisältämät sekundäärimetaboliitit parantavat kasvin selviämiskykyä. Itse maitiaisneste toimii mekaanisena ja kemiallisena suojana herbivoriaa vastaan. Maitiaisnesteen alkaloidit ehkäisevät myös herbivoriaa, ja puolustavat kasveja myös patogeenejä sekä kilpailevia kasveja vastaan.

2. Johdanto

Oopiumunikko (*Papaver somniferum*) on kaksisirkkainen unikkokasvien (Papaveraceae) heimoon kuuluva yksivuotinen kukkakasvi, joka kasvaa noin 30-70 cm pitkäksi (Mahdavi-Damghani ym., 2010). Oopiumunikkoa viljellään sen tuottamien lääkeaineiden vuoksi, mutta oopiumunikkoa hyödynnetään myös kosmetiikassa, parfyymeissä, ruokaöljyissä ja sen siemeniä käytetään esimerkiksi leivonnassa. Kasvin viljely on levittäytynyt maailmanlaajuisesti johtuen oopiumunikon pitkästä viljelyhistoriasta (Dittbrenner ym., 2009). Oopiumunikkoa on viljelty useiden vuosituhannen ajan ja se on yksi harvoista kasvilajeista, joiden viljelystä on havaintoja jo neoliittiseltä kaudelta. Oopiumunikon tuottamat lääkeaineet ovat kasvin sekundäärimetaboliitteja, joita on hyödynnetty jo keskiajalla sen aikaisen lääkkeen, teriakkin, ainesosana.

Sekundäärimetaboliitit eli sekundääriaineenvaihduntatuotteet ovat kasvien tuottamia yhdisteitä, jotka eivät ole välttämättömiä kasvin normaalille kasvulle ja kehitykselle (Lee ym., 2013).

Sekundäärimetaboliitit eivät ole myöskään aivan turhia kasvin selviytymisen kannalta, sillä ne parantavat kasvin kykyä adaptoitua eri stressitekijöitä vastaan. Oopiumunikossa merkittävä sekundäärimetaboliittien ryhmä on bentsyyli-isokinoliset alkaloidit (BIA). Nämä alkaloidit parantavat kasvin stressinsietokykyä abiottisia ja bioottisia tekijöitä vastaan ja ne auttavat kilpailussa muita kasveja vastaan. Bentsyyli-isokinolisilla alkaloideilla on myös suuri lääketieteellinen merkitys yhä tänäkin päivänä.

Oopiumunikossa yleisimpiä ja lääketieteellisesti merkittäviä bentsyyli-isokinolisia alkaloideja ovat morfiiniset alkaloidit, eli morfiini, tebaiini ja kodeiini (Singh ym., 2019). Morfiinia ja kodeiinia käytetään kipulääkkeenä ja kumpikin alkaloidi on maailman terveysjärjestön WHO:n mukaan yksi tärkeimmistä lääkeaineista. Lääketieteellisen käytön lisäksi oopiumunikon tuottamasta maitiaisnesteestä sekä varsista saatavasta morfiinista syntetisoidaan laittomasti heroiniä, joka on kannabiksen jälkeen eniten käytetty huumausaine. Morfiinisten alkaloidien synteettinen valmistus on hankalaa, minkä vuoksi oopiumunikko on ainoa kaupallinen lähde näiden lääkeaineiden valmistuksessa. Kolmatta morfiinista alkaloidia tebaiinia käytetään kipulääkkeiden, kuten oksykodonin, lähtöaineena. Bentso[c]fenantridiineihin kuuluva antimikrobiaalinen sanguinariini on potentiaalinen syöpää ehkäisevä alkaloidi, kuten myös ftalidi-isokinoleihin kuuluva antimitoottinen noskapiini. Noskapiinia on myös käytetty yskänhillitsijänä. 1-bentsyyli-isokinoleihin kuuluva BIA papaveriinilla taas on verisuonia laajentava vaikutus, mikä taas vaikuttaa verenpaineeseen.

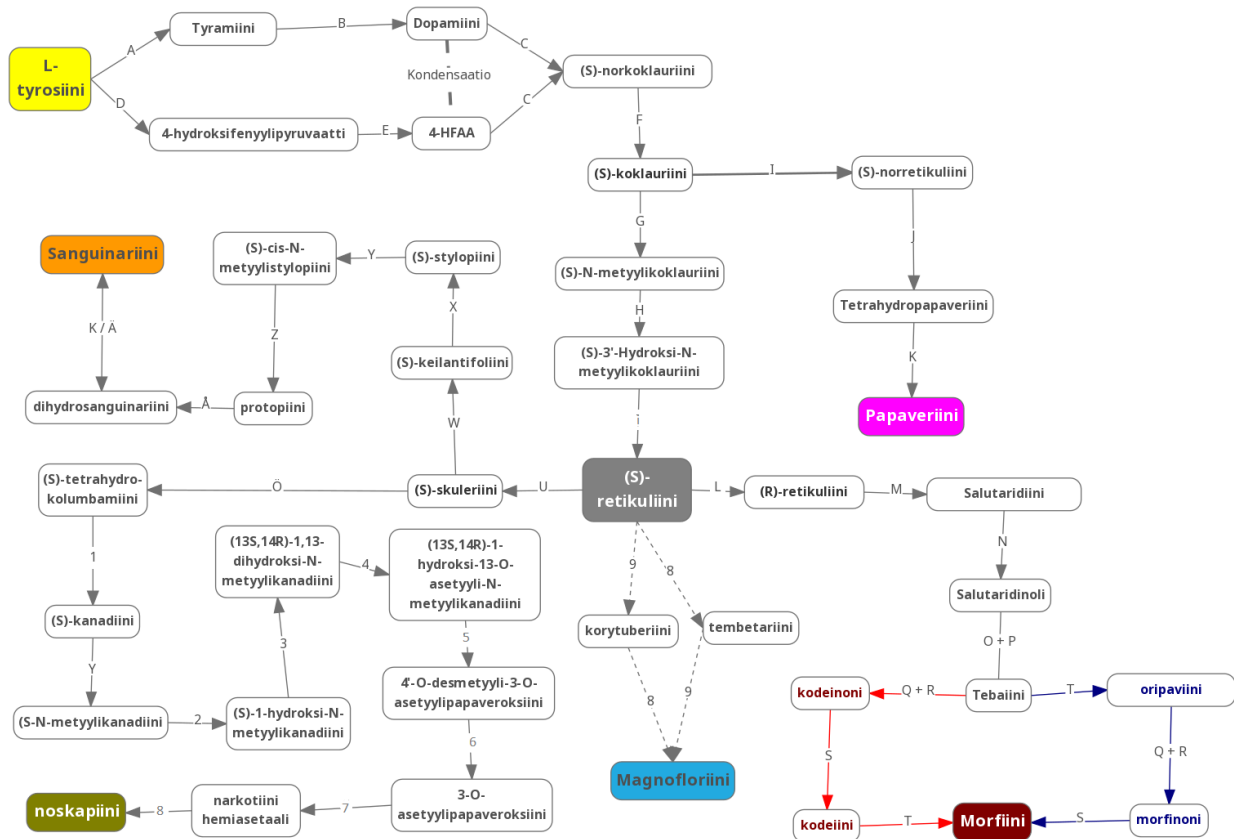
Papaveriini myös rentouttaa sileää lihaskudosta. Muista farmakologisesti merkittävistä bentsyyli-isokinolisista alkaloidista poiketen papaveriinia tuotetaan synteettisesti lääketieteellisiin tarkoituksiin (Hagel & Facchini, 2013). Aporfiineihin kuuluvalla magnofloriinilla taas arvellaan olevan mahdollisia kasvaimia, syöpää sekä diabetesta ehkäiseviä vaikutuksia (Morris & Facchini, 2016). Magnofloriini mahdollisesti myös ehkäisee ja lievittää tulehdusreaktioita, toimii sedatiivina eli rauhoittavana aineena ja lievittää ahdistusta.

Bentsyyli-isokinoliset alkaloidit (BIA) ovat rakenteellisesti monimuotoinen ja suuri sekundäärimetaboliittien ryhmä, joista tunnetaan noin 2500 eri molekyyliä (Singh ym., 2019). Näitä alkaloidia on löydetty Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae sekä Menispermaceae kasvisheimoista, jotka kuuluvat alkeellisten kaksisirkkaisten (eng. basal angiosperm) Ranunculales lahkoon. Kaikki BIA-sekundääriaineenvaihduntatuotteet sisältävät typpiryhmän ja monilla alkaloidilla on kiraliakeskus, eli molekyylin atomiin on sitoutunut useita erilaisia atomeja tai atomiryhmiä. Oopiumunikossa bentsyyli-isokinoliset alkaloidit johdetaan aromaattisesta aminohaposta L-tyrosiinista (Liscombe & Facchini, 2008). Bentsyyli-isokinolisten alkaloidien biosynteesi morfiiniksi, tebaiiniksi, kodeiiniksi, sanguinariiniksi, magnofloriiniksi, noskapiiniksi ja papaveriiniksi on monien biokemiallisten reaktioiden ja niitä katalysoivien entsyymien tuotetta. Näiden sekundäärimetaboliittien vaikutukset ovat tutumpia ihmisillä ja muilla selkärangkaisilla, mutta BIA:en biosynteesi, sen säätely, fysiologiset sekä ekologiset vaikutukset ovat vielä osittain tuntemattomia itse niitä tuottavissa kasveissa.

Tämän kandidaatintutkielman tarkoituksena on perehtyä bentsyyli-isokinolisten alkaloidien biosynteesireittiin, sekä tarkastella siihen vaikuttavia tekijöitä. Tutkielmassa selvitetään myös bentsyyli-isokinolisten alkaloidien merkitystä oopiumunikossa.

3. Bentsyyli-isokinolisten alkaloidien biosynteesi

Oopiumunikossa esiintyvät BIA:t on jaettu neljään alaluokkaan; 1-bentsyylikinoleihin, protoberberiineihin, protopiineihin, aporfiineihin, morfiineihin, benzo[c]fenantridiineihin sekä ftalidi-isokinoleihin (Hagel & Facchini, 2013; Singh ym., 2019). Monimutkaiset biosynteesiketjut alkavat kahden aromaattisen L-tyrosiinin, aminohapon, johdannaisten kondensaatiolla eli yhteenliittymisellä (Kuva 1.).



Kuva 1. Bentsyyli-isokinolisten alkaloidien (BIA) biosynteesi. Kaavio on rakennettu (Singh ym., 2019) artikkelin tekstin pohjalta. Kahden L-tyrosiinijohdannaisen (keltainen) kondensaation jälkeen muodostunut (S)-retikuliini (harmaa) on bentso[c]fenantridiineihin kuuluva sanguinariinin (oranssi), ftalidi-isokinoleihin kuuluva noskapiinin (vihreä), morfiinisiin alkaaloideihin kuuluvan morfiinin (punainen) sekä aporfiineihin kuuluva magnofloriinin (sininen) välituote. Magnofloriinin biosynteesin välituotteet ja reaktiomekanismit ovat vielä epävarmoja (JS & PJ, 2016), mikä on osoitettu kaaviossa katkoviivoin. Morfiinin biosynteesireitillä siniset nuolet viittaavat sivureittiin ja punaiset nuolet taas pääasialliseen biosynteesireittiin. 1-bentsyylikinoleihin kuuluva papaveriinia (pinkki) syntetisoidaan (S)-koklauriinista. Kaaviossa molekyylien biosynteesiä katalysoivat entsyymit on osoitettu kirjaimin A-Ö sekä numeroin 1-8. A = tyrosiinidekarboksylaasi, B = tunnistamaton hydroksylaasi, C = norkoklauriinisyntaasi, D = tyrosiiniaminotransferaasi, E = tunnistamaton dekarboksylaasi, F = norkoklauriini 6-O-metyylitransferaasi, G = koklauriini N-metyylitransferaasi, H = N-metyylikoklauriini 3'-hydroksylaasi, I = 3'-hydroksi-N-metyylikoklauriini 4'-O-metyylitransferaasi, J = norretikuliini 7-O-metyylitransferaasi, K = dihydrobentsofenantridiinioksidaasi, L = retikuliiniepimeraasi, M = salutaridiinisyntaasi, N = salutaridiinireduktaasi, O = salutaridinoli 7-O-asetyyli-transfer tebaiinisyntaasi, P = tebaiinisyntaasi, Q = tebaiini 6-O-demetylaasi, R = neopinoni-isomeraasi, S = kodeinonireduktaasi, T = kodeiini O-demetylaasi, U = berberiinisiltaentsyyymi, W = keilantifoliinisyntaasi, X = stylopiinisyntaasi, Y = tetrahydroprotoberberiini N-

metyylitransferaasi, Z = N-metyylistylopiini 14-hydroksylaasi, Å = protopiini 6-hydroksylaasi, Ä = sanguinariiniireduktaasi, Ö = skuleriini 9-O-metyylitransferaasi, 1 = kanadiinisyntaasi, 2 = N-metyylikanadiini 1-hydroksylaasi, 3 = 1-Hydroksi-N-metyylikanadiini 13-O-hydroksylaasi, 4 = 1,13-dihydroksi-N-metyylikanadiini 13-O-asetyylitransferaasi, 5 = -Hydroksi-13-O-asetyyli-N-metyylikanadiini 8-hydroksilaasi, 6 = 4'-O-desmetyyli-3-O-asetyylipapaveroksiini 4'-O-asetyylitransferaasi, 7 = 3-O-asetyylipapaveroksiinikarboksyliesteraasi, 8 = noskapiinisyntaasi.

3.1 (S)-retikuliini

(S)-retikuliini on monien bentsyyli-isokinolisten alkaloidien (BIA) biosynteesissä viimeinen yhteinen välituote, jonka muodostumisessa reaktioketjun vaiheisiin kuuluu entsyymien katalysoimia 3'-hydroksylaatioita sekä O- että N-metylaatioita (Hagel & Facchini, 2013). (S)-retikuliinin biosynteesi alkaa (S)-norkoklauriinin muodostumisella, joka on kaikkien BIA yhdisteiden esiaste (Bird & Facchini, 2001). (S)-norkoklauriini muodostuu kahdesta tyrosiinijohdannaisen, 4-hydroksifenyyliaetaldehydin (4-HFAA) ja dopamiinin kondensoitumisesta (Bird & Facchini, 2001). Toinen L-tyrosiini transaminoituu eli molekyylin aminoryhmä siirtyy vastaanottajamolekyylille ja 4-hydroksifenyylipyruvaatti muodostuu (Beaudoin & Facchini, 2014). Tämän jälkeen 4-hydroksyylifenyylipyruvaatti dekarboksyloituu 4-HFAA:ksi. Dekarboksylaatiossa molekyylistä irtoaa karboksyyliryhmä (-COOH). Toinen (S)-norkoklauriinin lähtöaine, dopamiini, dekarboksyloituu L-tyrosiinista tyramiiniksi, joka hydroksyloituu vielä tunnistamattomalla entsyymillä dopamiiniksi. Hydroksylaatiossa entsyymi liittyy substraattiin hydroksyyliryhmän (OH-ryhmän). 4-HPAA muodostaa (S)-norkoklauriiniin C1-sidotun benzyyliryhmän ja dopamiini taas muodostaa tetrahydroisokinolisen osan molekyyliin ja tätä kondensoitumista katalysoi entsyymi, joka muodostaa 4-HFAA ja dopamiinin välille hiili-hiilidoksen (Hagel & Facchini, 2013).

L-tyrosiinijohdannaisten kondensaatiosta muodostunut (S)-norkoklauriini O-metyloidaan (S)-koklauriiniksi (Dastmalchi ym., 2018). O-metylaatiossa substraatin happimolekyyli sitoo itseensä happimolekyylin. Välituote (S)-koklauriini on biosynteesireitillä risteymäkohta papaveriinin ja (S)-retikuliinin biosynteesissä (Hagel & Facchini, 2013). (S)-retikuliinin synteesissä (S)-koklauriinin typpiin liittyy metyyliryhmä ja seuraava N-metyloitu välituote on (S)-N-metyylikoklauriini (Singh ym., 2019). CNMT:t ovat metyylitransferaaseja, jotka siirtävät metyyliryhmiä

luovuttajamolekyyliltä vastaanottajamolekyylille (Dastmalchi ym., 2018). Sekä O-metyylitransferaasit että N-metyylitransferaasit vastaanottavat substraatille siirrettävän metyyliiryhmän S-adenosyylimetioniinilta (SAM).

Syntetisoinnin jälkeen (S)-N-metyylikoklauriini hydroksyloituu (S)-3'-metyylikoklauriiniksi (S)-N-metyylikoklauriini 3'-hydroksylaasin katalysoimana (NMCH) (Beaudoin & Facchini, 2014).

Happomarjoihin kuuluvassa *Berberis stolonifera* (Koehne & E. Wolf) lajissa (S)-N-metyylikoklauriini voidaan myös syntetisoida berbamuniiniksi berbamuniini syntaasin katalysoimana (CYP80A1) (Beaudoin & Facchini, 2014). NMCH on oopiumunikossa nimetty CYP80B3 ja se kuuluu sytokromi P450 (CYP) superentsyymiperheeseen (Dastmalchi ym., 2018). NMCH on avainasemassa BIA-yhdisteiden biosynteesissä (Desgagné-Penix & Facchini, 2012). Tutkijat havaitsivat, että transgeenisissä oopiumunikoissa NMCH yliekspressio lisäsi kasvin alkaloidipitoisuutta 450%. Samassa tutkimuksessa havaittiin, että NMCH:n hiljentäminen alensi tutkittavien kasvien alkaloidien kertymistä 84%. Viimeisenä (S)-3'-metyylikoklauriini O-metyloidaan (S)-retikuliiniksi (Beaudoin & Facchini, 2014).

(S)-koklauriini on papaveriinin lähtöaine ja (S)-retikuliini on magnofloriinin, morfiinin, sanguinariinin sekä noskapiinin lähtöaine (Singh ym., 2019). (S)-retikuliinin muokkaus näiksi alkaloidiksi on monivaiheinen biosynteesiketju, jossa sekä entsyymeillä että spontaaneilla reaktioilla on osuutta alkaloidien synnyssä. (S)-retikuliinin stereokemiallinen inversio (R)-retikuliiniksi johtaa promorfinaanisten, kuten salutaridiinin ja salutaridinolin, sekä morfinaanisten alkaloidien, tebaiinin, kodeiinin ja morfiinin biosynteesiin (Pienkny ym., 2009). Monien muiden BIA alaryhmien biosynteesin yhteinen välituote on protoberberiini (S)-skuleriini, joka syntyy kun (S)-retikuliinin fenolisen renkaan sekä N-metyyliiryhmän hiilten välille muodostuu sidos.

3.2 Morfiini

Promorfisiin alkaloidihin kuuluvat salutaridiini, salutaridiini 7-O-asettaatti sekä salutaridinoli (Hagel & Facchini, 2013). Morfisia alkaloidia ovat taas tebaiini, kodeinoniini, kodeiini, oripaviini, morfinoni sekä morfiini. Luonnossa ainoastaan oopiumunikko ja sen sukulaislajit biosyntetisoivat morfiinia, mutta morfiinin merkitys kasvissa on edelleen epäselvä (Hagel & Facchini, 2013). Friedrich Serturmer eristi ensimmäisenä morfiinia oopiumunikon maitiaisnesteestä 1800-luvulla ja myöhemmin 1925-luvulla Robert Robinson selvitti morfiinin kemiallisen rakenteen (Singh ym., 2019). Morfiinia ja sen biosynteesiä on tutkittu jo kauan, mutta vasta 2019 löydettiin uusi

entsyymi, joka katalysoi tebaiinin ja oripaviinin isomerisaatiota kodeinoniksi ja morfinoniksi. Vielä muutama vuosi sitten tebaiinin biosynteesi kodeinoniksi ajateltiin olevan osin spontaanireaktio (Beaudoin & Facchini, 2014).

BIA-yhdisteiden biosynteesireitti risteytyy kohti morfiinia, kun (S)-retikuliini käännetään (R)-enantiomeerikseen. Enantiomeerit ovat molekyylejä, jotka muodostuvat samoista komponenteista, mutta joiden kolmiulotteinen rakenne on erilainen. Ensin (S)-retikuliini hapettuu 1,2-dehydroretikuliiniksi, joka pelkistyy (R)-retikuliiniksi (Singh ym., 2019). Tätä reaktiota katalysoi retikuliiniepimeraasi (REPI). REPI entsyymillä on keskeinen rooli oopiumunikon fysiologiassa ja biosynteesireitin haaroittumisessa, sillä kun REPI oli hiljennetty oopiumunikossa, kasvien (S)-retikuliinin ja esimerkiksi noskapiinin määrä lisääntyi ja morfiinisten alkaloidien määrä laski (Singh ym., 2019).

(R)-retikuliini hapetetaan salutaridiiniksi, joka on promorfinen alkaloidi (Singh ym., 2019). Tämän jälkeen salutaridiini pelkistyy promorfiseksi salutaridinoliksi, jonka jälkeen alkaloidi asetyloidaan promorfiseksi salutaridinoli 7-O-asetaatiksi (Singh ym., 2019). Asetylaatiassa entsyymi siis liittää substraattiin asetyyliryhmän ($-\text{COCH}_3$). Tämän jälkeen salutaridinoli 7-O-asetaatista syntetisoituu tebaiiniksi, joka on morfinen alkaloidi. Vielä muutama vuosi sitten ajateltiin, että salutaridinoli 7-O-asetatin muuttuminen on spontaani reaktio, eli reaktioon ei osallistuisi mikään entsyymi (Dastmalchi ym., 2018).

Biosynteesireittejä tebaiinista morfiiniksi on kaksi; pääreitti ja sivureitti (Singh ym., 2019). Pääreitillä tebaiini O-demetyloidaan, eli happelta poistuu metyyliiryhmä ja muodostuu neopinonia (Ziegler ym., 2009). Tämän jälkeen neopinoni isomerisoidaan entsyymien katalysoimana kodeinoniksi ja myös tämän reaktion ajateltiin aiemmin olevan spontaania (Singh ym., 2019). Tämän jälkeen kodeinoni pelkistyy kodeiiniksi, joka O-demetyloidaan viimein morfiiniksi.

Sivureitillä tebaiini O-demetyloidaan oripaviiniksi, joka uudelleen O-demetyloidaan neomorfinoniksi (Ziegler ym., 2009). Tämän jälkeen neomorfinoni isomerisoidaan entsyymaattisesti morfinoniksi. Kuten morfiinin biosynteesin pääreitillä, myös sivureitillä tapahtuvan isomerisaation ajateltiin aiemmin olevan spontaania. Sivureitin viimeisessä vaiheessa morfinoni pelkistyy morfiiniksi.

3.3 Papaveriini

Papaveriini kuuluu 1-bentsyylikinoleihin (Hagel & Facchini, 2013), jonka hypoteettinen biosynteesireitti esitettiin ensimmäisen kerran jo vuonna 1910, mutta aihe on edelleen kiistanalainen (Desgagné-Penix & Facchini, 2012). Papaveriinin biosynteesin on ehdotettu tapahtuvan joko NH- tai NHC3-reitin kautta. NH-reitin välituotteet ovat kokonaan N-desmetyloituja eli molekyylin typpiatomista on irtautunut metyyliryhmä ja papaveriini syntetisoidaan (S)-koklauriinista. NHC3 reitillä (S)-koklauriinin sijaan biosynteesin haarautumiskohtana on (S)-retikuliini ja biosynteesireitillä on useita N-metyloituja välituotteita, eli molekyylin typpi atomi on sitonut itseensä metyyliryhmän.

Biosynteesi alkaa sekä NH- että NHC3-reitillä kahden L-tyrosiinijohdannaisen kondensoitumisella (S)-norkoklauriiniksi, joka O-metyloidaan (S)-koklauriiniksi (Desgagné-Penix & Facchini, 2012). NH-reitillä (S)-koklauriini ensin hydroksyloidaan ja sitten metyloidaan (S)-6-O-metyylinorlaudanosiiniksi. (S)-6-O-metyylinorlaudanosiini muuttuu (S)-norretikuliiniksi, joka käännetään (S)-norlaudaniiniksi entsyymillä norretikuliini 7-O-metyylitransferaasin (N7OMT) avulla. Kasvien metyylitransferaaseilla katalysoivat yleensä useampaa kuin yhtä substraattia (Han ym., 2010), mutta N7OMT metyloi yksinomaan (S)-norretikuliinia (Desgagné-Penix & Facchini, 2012). Tämän jälkeen (S)-norlaudaniini syntetisoidaan tetrahydropapaveriiniksi ja viimeisenä NH-reitillä tetrahydropapaveriini muuttuu lopulta papaveriiniksi (Singh ym., 2019).

Desmetyloidulla NHC3-reitillä (S)-koklauriini N-metyloituu, hydroksyloituu ja lopuksi O-metyloituu (S)-retikuliiniksi, joka taas O-metyloituu (S)-laudaniiniksi (Desgagné-Penix & Facchini, 2012). (S)-laudaniini O-metyloidaan tunnistamattomalla entsyymillä (S)-laudanosiiniksi, joka N-demetyloituu sitten tetrahydropapaveriiniksi. Tämän jälkeen tetrahydropapaveriini dehydrogenoituu lopuksi papaveriiniksi. Dehydrogenaatiossa orgaaniselta molekyyliltä poistuu vety atomi.

NH-reittiä tukevat Desgagné-Penixin ja Facchinin (2012) tutkimus, jossa tutkijat selvittivät papaveriinin ja muiden BIA yhdisteiden biosynteesissä potentiaalisesti olennaisten geenien vaikutusta viruksen indusomalla geenin hiljennyksellä (VIGS, eng. virus-induced gene silencing). Entsyymiä N7OMT koodaavan geenin ekspression lasku vähensi merkittävästi papaveriinin määrää oopiumunikossa, muttei vaikuttanut muiden BIA:en määrään. Samassa tutkimuksessa havaittiin myös, että CNMT hiljennys nelinkertaisti papaveriinin määrän tutkittavissa kasveissa. (S)-retikuliinin biosynteesissä keskeinen entsyymi CNMT katalysoi (S)-koklauriinin (S)-N-

metyyliokklauriiniksi, joten tämä tulos todistaa, että NH-reitti on NHC3-biosynteesireittiä todennäköisempi (Desgagné-Penix & Facchini, 2012). Tutkimuksen mukaan (S)-retikuliinin synteesireitillä katalysoivan 7OMT hiljennys ei vaikuttanut papaveriinitasoihin.

3.4 Magnofloriini

Myös aporfiineihin kuuluvan magnofloriinin biosynteesi haarautuu retikuliinista, vaikka tosin kyseisen välituotteen stereokemia on tuntematon (Singh ym., 2019). Biosynteesisiis alkaa joko (S)-tai (R)-retikuliinista. Mahdollisia magnofloriinin biosynteesireittejä on kaksi, joissa ensimmäisessä välituote korytuberiini muodostuu, kun retikuliinin kaksi fenoliryhmää yhdistetään hiili-hiili sidoksella (Singh ym., 2019). Tämän jälkeen korytuberiini N-metyloidaan entsyymaattisesti magnofloriiniksi. Toisessa ehdotetussa reitissä syntetisoidaan myös kahden fenolirenkaan välille sidos ja typpi-atomiin liitetään metyyliryhmä, mutta vain eri järjestyksessä (Morris & Facchini, 2016). Toisella reitillä retikuliini N-metyloidaan ensin tembetariiniksi, jonka jälkeen lopputuote magnofloriini on valmis, kun välituotteen tembetariinin fenolirenkaaseen lisätään hiili-hiili sidos (Morris & Facchini, 2016).

3.5 Sanguinariini

Bentso[c]fenantridiineihin kuuluva sanguinariini on symmetrinen ja tasomainen molekyyli, jonka biosynteesi haarautuu (S)-retikuliinista (Singh ym., 2019). Suurin osa sanguinariinin biosynteesiä katalysoivien entsyymigeenien ekspressiosta eli ilmentymisestä tapahtuu juurissa (Singh ym., 2019). Synteesin alussa entsyymi syntetisoi kahden hiiliatomin välille sidoksen, jonka johdosta (S)-retikuliinista muodostuu protoberberiinirunko (S)-skuleriini (Dastmalchi ym., 2018). Seuraava välituote, (S)-keilantifoliini, syntetisoidaan, kun (S)-skuleriini hapettuu ja molekyylin sisälle muodostuu metyleenidioksisilta eli kaksi happiatomia yhdistyvät -CH₂- kautta (Dastmalchi ym., 2018). (S)-keilantifoliinin sisälle syntetisoidaan uusi metyleenidioksisilta ja keilantifoliinista muodostuu (S)-stylopiini (Dastmalchi ym., 2018). Metyleenisiltojen muodostumisen jälkeen (S)-stylopiini N-metyloituu (S)-cis-N-metyylistylopiiniksi, joka sitten hydroksyloituu kolmanneksi viimeiseksi välituotteeksi, protopiiniksi (Singh ym., 2019). Protopiinista muodostuu dihydrosanguinariini, kun entsyymien katalysoima hydroksylaatio johtaa molekyylin spontaaniin uudelleenjärjestäytymiseen. Dihydrosanguinariini hapettuu ja molekyylin rengas aromatisoituu ja lopputuote sanguinariini muodostuu. Sanguinariini on sytotoksinen eli soluille haitallinen yhdiste,

minkä vuoksi sanguinariini voi pelkistyä entsyymien katalysoimana takaisin dihydrosanguinariiniksi (Singh ym., 2019).

3.6 Noskapiini

Noskapiinia esiintyy runsaasti oopiumunikon maitiaisnesteessä, ja se oli yksi ensimmäisistä alkaloideista, joka eristettiin lajista (Hagel & Facchini, 2013). Kuten bentso[c]fenantridiinien biosynteesissä, myös ftalidi-isokinoleihin kuuluvan noskapiinin biosynteesi alkaa (S)-skuleriinista, joka on muodostunut (S)-retikuliinista, kun kahden hiilidoksen välille on syntetisoitu sidos (Singh ym., 2019). Protoberberiinin (S)-skuleriinin O-metylaatio johtaa monivaiheiseen ftalidi-isokinolien biosynteesiin. (S)-skuleriini O-metyloidaan (S)-tetrahydrokolumbamiiniksi, jonka jälkeen (S)-tetrahydrokolumbamiinin bentseenirenkaaseen syntetisoidaan metyleenidioksisila ja (S)-kanadiniini muodostuu. (S)-kanadiniini N-metyloituu (S)-N-metyylikanadiniiniksi, joka taas hydroksyloituu (S)-1-hydroksi-N-metyylikanadiniiniksi, joka hydroksyloidaan uudelleen (13S,14R)-1,13-dihydroksi-N-metyylikanadiniiniksi. Seuraava entsyymi liittää (13S,14R)-1,13-dihydroksi-N-metyylikanadiniiniin asetyyli-ryhmän (-COCH₃) ja muodostuu seuraava välituote, (13S,14R)-1,13-dihydroksi-13-O-asetyyli-N-metyylikanadiniini. Edellä mainitun välituotteen hydroksylaatio johtaa spontaaniin rengasrakenteen avautumiseen ja 4'-O-desmetyyli-3-O-asetyyli-papaveroksiini muodostuu, joka O-metyloituu heterodimeerisen proteiini-kompleksin katalysoimana 3-O-asetyyli-papaveroksiiniksi. Tämä heterodimeerinen proteiini-kompleksi koostuu kahdesta O-metyyli-transferaasista; OMT2:sta ja joko OMT3:sta tai OMT6:sta. Park ym. (2018) tutkimuksen mukaan entsyymien heterodimeeristä muotoa tukee havainto *Escherichia coli*-bakteerissa tehdyssä tutkimuksessa, minkä perusteella OMT2 ja OMT3 geenit ekspressoituvat samanaikaisesti. Entsyymissä OMT2 oli heidän mukaansa korvaamaton heterodimeerissä, mutta OMT3 ei ole välttämätön entsyymien toiminnalle, sillä OMT3 geenin hiljennysanalyysissä havaittiin OMT6-proteiinin korvaavan OMT3:n. Seuraavaksi biosynteesireitillä 3-O-asetyyli-papaveroksiinin esterisidos hydrolysoituu eli katkeaa ja viimeinen välituote narkotiini hemiasetaali muodostuu. Narkotiini hemiasetaalin OH-ryhmä dehydrogenoituu, eli OH-ryhmästä poistuu vety, joka johtaa lopputuotteen eli noskapiinin muodostumiseen (Singh ym., 2019).

3.7 Bentsyyli-isokinolisten alkaloidien biosynteesi ja kuljetus kasvisolussa

Bentsyyli-isokinoliset alkaloidit voivat olla haitallisia itse kasville, minkä vuoksi ne varastoituvat kasveissa joko vakuoleihin tai maitiaisputken vesikkeleihin (Singh ym., 2019). Muut alkaloidit, kuten morfiini, kertyvät maitiaisputken vesikkeleihin, mutta sanguinariini kertyy pääasiallisest oopiumunikon juuriin. Biosynteesiä sekä solunsisäistä bentsyyli-isokinolisten alkaloidien kuljetutusta on mallinnettu sanguinariinilla, joka on sytotoksinen eli soluille myrkyllinen sekundäärimetaboliitti. Varastoimalla sanguinariinia vakuoleihin kasvi puolustautuu sen aktiivisilta sytotoksisilta vaikutuksilta solulimassa.

Tutkijoiden Singh A ym. (2019) mukaan sanguinariinin mahdollista solunsisäistä kuljetusta on tutkittu heräteainekäsitellyillä (eng. elicitor-treated) oopiumunikon solukkoiljelyissä. Heräteaineet ovat molekyylijä, jotka indusoivat kasvin puolustusmekanismia sitoutumalla reseptorimolekyyliin. Tämän avulla oopiumunikon soluista on paikannettu 12 entsyymiä, jotka osallistuvat sanguinariinin biosynteesiin. Nämä entsyymit ovat norkoklauriinisyntaasi (NKS), norkoklauriini 6-O-metyylitransferaasi (6OMT), koklauriini N-metyylitransferaasi (KNMT), N-metyylikoklauriini 3'-hydroksylaasi (NMKH), 3'-hydroksyyli-N-metyylikoklauriini 4'-O-metyylitransferaasi (4'OMT), berberiinisilta-entsyymi (BSE), keilantifoliinisyntaasi (KFS), stylopinisyntaasi (SPS), tetrahydroproberberiini N-metyylitransferaasi (TNMT), N-metyylistylopiini 14-hydroksylaasi (MSH), protopiini 6-hydroksylaasi (P6H) ja dihydrobentsofenantridiinioksidaasi (DBOKS).

Sanguinariinin biosynteesi ja sen hypoteettinen kuljetus vakuoliin alkaa solulimasta, kun L-tyrosiinin johdannaiset 4HFAA ja dopamiini kuljetetaan solulimakalvoston lumeniin, jonka jälkeen entsyymi NKS katalysoi lähtöaineiden kondensaation ja (S)-norkoklauriini muodostuu (Singh ym., 2019). (S)-retikuliinin biosynteesiin osallistuvien entsyymien, 6OMT:n, KNMT:n, NMKH:n sekä 4'OMT:n, on havaittu sijaitsevan solulimassa, minkä vuoksi arvellaan, että (S)-norkoklauriinin biosynteesi (S)-retikuliiniksi voisi tapahtua solulimassa, Tämän jälkeen (S)-retikuliini kuljetetaan mahdollisesti takaisin solulimakalvoston lumeniin (S)-skuleriinin biosynteesiin, koska BSE sijaitsee lumenissa. Entsyymit KFS sekä SPS ovat ankkuroituneet solulimakalvoston kalvolle, minkä vuoksi (S)-skuleriinin synteesi stylopiiniksi tapahtuu taas soluliman puolella. Stylopiinin synteesiä (S)-cis-metyylistylopiiniksi katalysoiva TNMT sijaitsee solulimassa. Entsyymit MSH ja P6H ovat ankkuroituneet myös solulimakalvoston kalvolle, joten (S)-cis-metyylistylopiinin synteesi dihydrosanguinariiniksi täytynee tapahtua solulimassa. Dihydrosanguinariini kuljetetaan takaisin

solulimakalvoston luumeniin, jossa DBOKS syntetisoi välituotteesta sanguinariinia. Lopuksi sanguinariini kuljetetaan vesikkeleissä vakuoliin varastoon.

Vain sanguinariinin entsyymit sekä edellä mainittu mahdollinen solunsisäinen kuljetus on selvitetty, muiden BIA-yhdisteiden sijainnista ja biosynteesipaikasta ei löydy tutkittua tietoa (Singh ym., 2019). Ainoastaan aporfiinien, kuten magnofloriinin, biosynteesissä vaikuttavan N-metyylitransferaasista puuttuva signaalisekvenssi viittaa biosynteesin tapahtuvan solulimassa.

3.8 Bentsyyli-isokinolisten alkaloidien biosynteesin sijainti ja alkaloidien kuljetus kasvisolukoissa

Oopiumunikossa bentsyyli-isokinolisten alkaloidien biosynteesiä ja kumuloitumista eli kertymistä tapahtuu kaikissa kasvin elimissä (Liscombe & Facchini, 2008). Biosynteesistä ja alkaloidien kertymisestä vastaavat nilan kolme solutyyppeä; seurasolut, siiviläelementit sekä maitiaisputket. Nilan pääasiallisia tehtäviä kasvissa ovat ravinteiden ja muiden molekyylien kuljetus. Jotkut nilan solutyypit osallistuvat kasvin puolustukseen esimerkiksi patogeenejä vastaan biosyntetisoimalla, kuljettamalla ja vapauttamalla puolustusmolekyylejä. Näiden alkaloidien biosynteesireitillä tapahtuvia reaktioita, kuten molekyylien pelkistystä, hydroksylaatiota, metylaatiota sekä molekyylin sisäisten rakenteiden yhteenliittymistä, katalysoivat entsyymit. Nämä entsyymit sekä niitä koodaavat geenit ekspressoituvat eli ilmentyvät seurasoluissa, joista entsyymit kuljetetaan siiviläelementteihin. Seurasolut sijaitsevat siiviläelementtien eli siiviläputkisolujen vieressä.

Alkaloidien biosynteesi tapahtuu siiviläelementeissä, jonka jälkeen valmiit BIA:t kuljetetaan maitiaisputkiin. Maitiaisputket sijaitsevat nilassa kasvissa rinnakkain siiviläelementtien ja seurasolujen kanssa (Liscombe & Facchini, 2008). BIA:t kertyvät maitiasputken solujen solulimaan eli maitiaisnesteeseen (Lee ym., 2013). (S)-norkoklauriinin muuttumista (S)-retikuliiniksi katalysoivien entsyymien sekä morfiinisten alkaloidien ja sanguinariinin biosynteesissä vaikuttavien entsyymien ja niitä vastaavien RNA transkriptien ilmentyminen seurasoluissa on osoitettu RNA *in situ* hybridisaatiolla, jossa geeniekspressiota tutkitaan solukoissa merkittyjen komplementaaristen RNA- tai DNA-molekyylien avulla (Lee ym., 2013). Siiviläelementeiltä puuttuvat geeniekspressioon vaadittavat soluelimet, kuten tumat, minkä vuoksi entsyymien tuotanto tapahtuu seurasoluissa (Singh ym., 2019). Biosynteesin jälkeen alkaloidien välituotteet

kuljetetaan maitiaisputkiin joko apoplastisesti eli soluseinän kautta kuljettajaproteiinien avulla, tai symplastisesti plasmodesmien kautta (Singh ym., 2019).

Kaikki *Papaver* sukuun kuuluvat kasvit säilövät bentsyyli-isokinolisia alkaloideja maitiaisputkien maitaisnesteessä (Lee ym., 2013). Yleensä maitaisnesteen sekundäärimetaboliitit ovat kasville haitallisia, ja maitiaisputkien ajatellaan kehittyneen pitämään erikoistuneet metaboliitit erillään putkisolukoista (Hagel ym., 2008). Maitiaisputket ovat erikoistuneita soluja, joiden ajatellaan olevan viimeisimmäksi kehittynyt solutyyppe kasveissa (Lee ym., 2013). Solut voivat olla nivelikkäitä tai nivelettömiä. Kumpikin maitaisputken solutyyppe on osa kasvin putkijärjestelmää, jonka sisällä BIA:t ovat eristettyinä soluliman vesikkeleihin. Nivelikkäät maitiaisputket ovat pitkiä yhteenliittyneitä soluja, joiden väliset soluseinät ovat joko kokonaan tai osittain hajonneita. Nivelettömät maitiaisputket ovat taas pitkiä yksittäisiä soluja, jotka voivat haarautua. Aiemmin ajateltiin, että sekä BIA-yhdisteiden biosynteesi, että alkaloidien kertyminen tapahtuu maitiaisputkissa (Weid ym., 2004). Vaikka suurin osa biosynteesistä tapahtuu siiviläelementeissä, tiettyjen alkaloidien viimeistely ja yleisimpien lopputuotteiden viimeiset biosynteesivaiheet voivat tapahtua maitiaisputken soluissa. Oopiumunikon maanpäällisiin osiin kertyvät pääasiassa morfiiniset alkaloidit, 1-bentsyyli-isokinolit, aporfiinit, ftalidi-isokinolit sekä bentso[c]-fenantridiinit. Magnofloriini sekä sanguinariini kertyvät pääasiassa oopiumunikon juuriin (Singh ym., 2019).

4. Biosynteesin säätely

4.1 Transkriptiofaktorit

Oopiumunikon BIA-yhdisteiden biosynteesissä vaikuttavia transkriptiofaktoreita on identifioitu vain muutama; WRKY, MYB sekä mahdollisesti C3H (Singh ym., 2019). Transkriptiofaktorit ovat proteiineja, jotka osallistuvat eukaryoottisolujen geenien säätelyyn sitoutumalla DNA:n promoottoreihin ja tehostajiin (Kakeshpour ym., 2015). DNA sekvenssissä promoottorialueet sijaitsevat geenien läheisyydessä ja promoottorialueeseen sitoutuvat transkriptiossa RNA-polymeraasi, joten promoottorit ovat keskeisessä roolissa geeniekspression säätelyssä.

WRKY-proteiinit ovat kasveissa esiintyviä transkriptiotekijöitä, jotka säätelevät monia tärkeitä biologisia tapahtumia (Kakeshpour ym., 2015). WRKY-proteiinit säätelevät kasvin vasteita haavoitukseen sekä abioottisiin ja bioottisiin stressitekijöihin. Lisäksi WRKY-proteiinit osallistuvat

erilaisiin kasvuun ja kehitykseen liittyviin mekanismeihin, kuten lehden seneskensiin, solukarvojen ja siemenen kehitykseen, itämiseen ja embyogeneesiin eli alkionkehitykseen. WRKY:t tunnistavat ja sitoutuvat DNA:n säätelyelementtiin, W-boksiin (eng. W-box), joka on tunnistettu olevan stressivastetta säätelevien geenien promoottori. WRKY:n rooli BIA-yhdisteiden biosynteesin alkuvaiheessa on mahdollinen, koska proteiinit voivat sitoutua myös biosynteesiin vaikuttavaan TYDC-promoottoriin. WRKY-proteiinit koostuvat konservoituneesta ydinsekvenssistä, WRKYGQK, joka sijaitsee proteiinin N-terminaalissa eli vapaassa aminohappopäässä ja stabiloivasta sinkki-ioneja sitovasta sinkkisormesta. Tämä proteiinien superperhe jaetaan kolmeen luokkaan, jotka eroavat toisistaan sinkkisormien rakenteen ja WRKY-proteiinidomeenien määrän perusteella. Tutkijat Kakeshpour ym. (2015) havaitsivat tutkimuksessaan, että oopiumunikossa WRKY domeenit kuuluvat luokkaan II, koska niissä on yksi WRKY domeeni ja C2H2 sinkkisormi motiivi (eng. motif), eli sinkkisormi muodostuu kahdesta kysteiinistä (C2) ja kahdesta histidiinistä (H2).

Aitotumaisten eliöiden yksi suurista transkriptiotekijöiden perheestä ovat MYB-proteiinit (Kakeshpour ym., 2015). MYB-proteiinit säätelevät solun kehitystä ja solusykliä, signaalien välitystä, hormonien synteesiä, abioottista ja bioottista stressivastetta sekä primaarista että sekundääristä aineenvaihduntaa. Sitoutumalla sekvenssispesifisti DNA:n promoottoriin MYB-proteiinit säätelevät geenien ilmentymistä lähetti-RNA:n tasolla. MYB proteiinien N-pää koostuu MYB proteiinidomeenista, joka koostuu kolmesta peräkkäisestä toistojaksosta. Proteiinin toisessa päässä, eli karboksyyli-päässä, ovat toistojaksot, jotka muodostavat proteiiniin sekundäärirakenteen α -heliksin eli alfakierteen. MYB-superperhe jaetaan neljään alaperheeseen niiden toistojaksojen lukumäärän perusteella. Oopiumunikon MYB-transkriptiofaktorissa on kaksi vierekkäistä toistojaksoa, joten se kuuluu alaperheeseen R2R3-MYB.

Kakeshpourin ym. (2015) tutkimuksessa MYB- sekä WRKY-proteiinien ilmenemistä tutkittiin oopiumunikon eri solukoissa ja he havaitsivat transkriptiofaktoreiden ilmentyvän eniten lehdissä, kodissa sekä varsissa ja vähiten juurissa. Oopiumunikon lehdissä näiden transkriptiofaktoreiden ilmeneminen oli kaikista suurinta. Tutkijoiden mukaan tämän voisi selittää WRKY:n ja MYB:n osallisuus lehden solukarvojen muodostumisessa, sillä lituruohossa (*Arabidopsis thaliana*) näiden transkriptiotekijöiden kompleksit säätelevät solukarvojen kehitystä lehden pinnalla.

4.2 Hormonaalinen säätely

BIA-yhdisteiden biosynteesissä vaikuttavien geenien ilmentymistä tutkitaan usein kasvihormonien avulla (Singh ym., 2019). Jasmonihappo, salisyylihappo, abskissihappo sekä etyleeni ovat kasvihormoneja, joilla on merkittävä rooli kasvin selviytymisessä taudinaiheuttajia vastaan (Gurkok ym., 2015). Jasmonihappo ja sen metyyliesteröity johdannainen metyylijasmonaatti (MeJa) säätelevät stressivasteen lisäksi kasvin kasvua ja kehitystä. Unikon MeJa-käsittely aiheuttaa alkaloidien kertymistä oopiumunikon taimissa ja soluviljelmissä. Tutkijat Gurkok ym. (2015) käsittelivät tutkimuksessaan oopiumunikon kodat metyylijasmonaatilla, joka toimii heräteenä (eng. elicitor). MeJa-käsittely indusoi BIA-biosynteesireitillä vaikuttavien geenien ilmentymistä ja nelinkertaisti tebainipitoisuuden unikon kodissa. MeJa-käsittelyn jälkeen kotien morfiinin ja noskapiinin määrä nousi huomattavasti. Toisessa tutkimuksessa tutkijat Huang ja Kutchan (2000) käsittelivät oopiumunikon soluviljelmiä metyylijasmonaatilla. Soluviljelmien MeJa-käsittely lisäsi sanguinariinin kerääntymistä, mutta morfiinia ei havaittu soluviljelmissä lainkaan. Erilaistumattomissa soluviljelmissä morfiinintuotanto ei onnistu, koska biosynteesiin osallistuvat erilaistuneet maitiaisputken solut.

Gibberilliini happo on kasvihormoni ja n-triakontanoli (eng. n-triacontanol) on kasveissa luonnollisesti esiintyvä kasvunkiihdyttäjä (Khan ym., 2007). Nämä ja monet muut kasvin kasvunsäätelijät osallistuvat kasvuun, kehitykseen sekä alkaloidien kertymiseen kasveissa. Tutkimuksessaan Khan ym. (2007) havaitsivat, että oopiumunikon lehtien käsittely gibberilliinihapolla ja n-triakontanolilla lisäsivät oopiumunikon pituutta, kotien määrää sekä haaroittumista. Kasvunkiihdyttäjien ajatellaan vaikuttavan positiivisesti kasvin ravinteidenottokykyyn ja fotosynteesin tehokkuuteen. Gibberilliinihapolla ja n-triakontanolilla tehty käsittely nosti morfiinin määrää oopiumunikossa yli 60%:lla. Kasvihormoneilla on siis vaikutusta BIA-biosynteesissä, mutta niiden molekyyli-tason vaikutuksista BIA-biosynteesissä ei ole vielä kovinkaan paljon tietoa.

4.3 Endofyytit

Endofyyttiset mikrobit osallistuvat oopiumunikossa sekundäärimetaboliittien tuotantoon ja myös lisäävät unikon kasvua ja sietokykyä abioottisia ja bioottisia stressitekijöitä vastaan (Pandey ym. 2016). Endofyytit ovat isäntäkasvin varsissa, lehdissä ja juurissa eläviä bakteereja ja sieniä. Mikrobit siirtyvät kasviin joko ilmarakojen, lehden epidermin tai juurien kautta. Tutkijat Pandey ym. (2016) mainitsevat artikkelissaan endofyyttien taloudellisesta hyödystä, sillä bentsyyli-

isokinolisten alkaloidien biosynteesin lisääminen mikrobin avulla voisi olla yksinkertaisempaa, taloudellisesti kannattavampaa ja sosiaalisesti hyväksyttävämpää, kuin esimerkiksi geenimanipuloitujen oopiumunikoiden kasvatusta.

Tutkijoiden Pandeley ym. (2016) tutkimuksessa tarkoituksena oli selvittää, missä ja mitä endofyyttejä oopiumunikossa esiintyy ja miten ne vaikuttivat BIA-yhdisteiden biosynteesiin sekä kasvin kasvuun. Tutkimuksessaan he käyttivät alkaloidipitoista oopiumunikkomuunnosta, sekä muunnosta, joka ei tuottanut bentsyyli-isokinolisia alkaloidia. Tutkittavat endofyytit eristettiin alkaloidipitoisen oopiumunikon lehdistä, varsista ja juurista. Nämä endofyytit inokuloitiin oopiumunikon siemeniin, joiden morfiinin, kodeiinin, tebaiinin, papaveriinin ja noskapiinin pitoisuutta arvioitiin. Erään *Acineto*-sukuun kuuluvan bakteerin havaittiin lisäävän BIA-yhdisteisiin vaikuttavien geenien ilmenemistä sekä alkaloidien biosynteesiä vähän alkaloidia tuottavan oopiumunikon kodissa huomattavasti. Esimerkiksi morfiinin määrä nousi alkaloidia tuottamattomassa oopiumunikossa 1044 %. Tutkijoiden Ray ym. (2019) tutkimuksessa havaittiin, että kun vähän alkaloidia tuottavaan oopiumunikkoa käsiteltiin sekä *Acineto*- että *Marmoricola*-bakteereilla, morfiinin tuotanto nousi yli 2000%:lla. Morfiinin, papaveriinin sekä noskapiinin biosynteesin kasvuun pystyi vaikuttamaan jopa vain yksi endofyytilaji lisäämällä BIA-yhdisteiden biosynteesin geeniekspressiota. Tutkimuksessa havaittiin myös, että endofyyttien vaikutus on solukkospesifistä, sillä juurten endofyytit eivät vaikuttaneet oopiumunikon fysiologiaan lehdistä ja varressa (Pandey ym., 2016). Oopiumunikon lehtien endofyytit mahdollisesti vaikuttavat kasvin fotosynteesikykyyn, ilmarakojen toimintaan ja haihduntaan, kun taas juurien endofyytit taas paransivat unikon satoa lisäämällä typpensidontaan vaikuttavan entsyymin aktiivisuutta ja kasvihormoneihin kuuluvan auksiinin tuotantoa. Endofyyttien siis tiedetään vaikuttavan BIA-yhdisteiden biosynteesin geeniekspressioon, mutta tarkkaa säätelymekanismia ei vielä tunneta (Singh ym., 2019).

4.4 MiRNA

Mikro-RNA:t eli miRNA:t ovat lyhyitä, yksijuosteisia, ei-koodaavia RNA-molekyylejä, jotka hiljentävät geenin ilmentymistä transkription jälkeisellä eli post-transkriptionaalisella inhibitiolla tai hajottamalla kohde-mRNA:ta (Boke ym., 2015). MiRNA:t säätelivät kasvin kasvua, kehitystä ja sekundäärimetaboliittien synteesiä. MiRNA:t säätelivät myös muita biologisia prosesseja kuten

kasvin fysiologista vastetta biottisiin ja abioottisiin stressitekijöihin. Bioottisia stressitekijöitä ovat esimerkiksi taudinaiheuttajia, ja abioottisia stressitekijöitä ovat esimerkiksi kuivuus ja kylmyys. MiRNA:t osallistuvat myös kasvin aineenvaihdunnan säätelyyn, hajottavat proteiineja tai osallistuvat solujen signaalinvälitykseen.

Oopiumunikosta on löydetty solukkospesifistä 20 miRNA:ta, jotka säätelevät BIA-metaboliaa post-transkriptionaalisesti (Sabzehzari & Naghavi, 2019). Solukkospesifisyydellä tarkoitetaan, että tietyt miRNA-molekyylit ilmentyvät tietyissä kasvin osissa, kuten kodissa, lehdissä, varsissa ja juurissa (Boke ym., 2015). Säätelyn kohdegeeneinä ovat *4'OMT*, joka osallistuu (S)-3'-metyylikoklauriinin kääntämisessä (S)-retikuliiniksi, sekä *7OMT*, joka kääntää (S)-retikuliinin (S)-laudanosiiniksi papaveriinin biosynteesireitillä. MiRNA:t myös osallistuvat (S)-retikuliinin biosynteesiin (S)-skuleriiniksi. Lisäksi tutkijoiden Boke ym. (2015) mukaan miRNA:t säätelevät TYDC, SalAT ja COR transkripteja. TYDC-entsyymi muokkaa L-tyrosiinista, BIA-lähtöaineesta, tyramiinia. Entsyymit SalAT ja COR taas osallistuvat morfiinisten alkaloidien biosynteesiin. Singh ym. (2019) mukaan miRNA-molekyylien avulla BIA:en, erityisesti morfiinisten alkaloidien, pitoisuutta oopiumunikon kodissa voisi nostaa. Vaikka miRNA-molekyylien kohdegeenit sekä solukkospesifisyys on osoitettu tutkimuksilla, näiden tarkka säätelymekanismi ja merkitys BIA:n biosynteesissä vaatii vielä lisää tutkimusta (Singh ym., 2019).

4.5 Ympäristön vaikutus alkaloidien biosynteesiin

Oopiumunikon kehityskaari jaetaan kuuteen vaiheeseen; taimien kasvuun, lehtiruusukkeen ja varren muodostumiseen, nappujen muodostumiseen, kukkimiseen, ja kotien kypsymiseen (Mahdavi-Damghani ym., 2010). Näihin vaiheisiin vaikuttaa merkittävästi valon määrä. Mahdavi-Damghani ym. (2010) kertovat artikkelissaan aiemmista tutkimuksista, joissa tutkijat testasivat eri valaistusolosuhteiden vaikutusta oopiumunikon kasvuun ja kehitykseen. Vuonna 1975 suoritetussa tutkimuksessa havaittiin, että oopiumunikon kukkimiselle kriittinen päivänpituus on 14–16 tuntia. Artikkelissa kerrotaan myös, että oopiumunikko on pitenevän päivän kasvi ja täten kukkii, kun valoisa ajanjakso on pidempi kuin yhtäjaksoinen pimeäjakso. Valon määrällä oli 1997 tehdyssä tutkimuksessa huomattavasti merkittävämpi vaikutus kasvin kehitykseen kuin lämpötilalla.

Veden vaikutusta oopiumunikon kehitykseen, kasvuun sekä alkaloidipitoisuuteen tutkittiin altistamalla *P. somniferum* L. nigrum varianttia eri olosuhteissa (Mahdavi-Damghani ym., 2010). Oopiumunikkoa kasvatettiin kahdessa eri paikassa, Cordobassa ja Carmonassa, Espanjan

eteläosissa. Tutkimuksessa havaittiin, että ilmarakojen johtokyky heikkeni 16% kun kastelua vähennettiin ja vesistressi sekä lyhyt vegetatiivinen vaihe vähensi oopiumunikon biomassaa. Liian aikainen kasvin kukinta alensi merkitsevästi BIA konsentraatiota kasvissa.

5. Bentsyyli-isokinolisten alkaloidien merkitys puolustuksessa

5.1 Bentsyyli-isokinolisten alkaloidien vaikutus kasvinsyöjiin

Bentsyyli-isokinoliset alkaloidit ja niitä varastoiva maitiaisneste edistävät kasvien selviytymistä kasvinsyöjiä ja mikrobeja vastaan. Tätä väitettä tukevat useat eri tutkimukset (esim. Lee ym., 2013). Kasvien, kuten oopiumunikon, tuottama maitiaisneste toimii itsessäänkin mekaanisena puolustuksena herbivoreja eli kasvinsyöjiä vastaan. Kun kasvi altistuu esimerkiksi kasvinsyöjän hampaiden aiheuttamalle mekaaniselle vauriolle, maitiaisneste valuu ulos kasvista (Agrawal & Konno, 2009). Maitiaisneste hyytyy tahmeaksi tullessaan kosketuksiin ilman kanssa.

Maitiaisnesteellä ajatellaan olevan adaptiivinen merkitys kasvilla, eikä sillä tiedetä olevan merkitystä primaariselle aineenvaihdunnalle (esim. ravinteiden kuljetuksessa). Ruokailevan kasvinsyöjän hampaat ja suun muut osat peittyvät maitiaisnesteellä, mikä ehkäisee kasvin altistumista herbivorialle (Lee ym., 2013).

Myös maitiasnesteeseen sisältämät sekundäärimetaboliitit ehkäisevät herbivoriaa (Lee ym., 2013). Alkaloidien myrkyllisyys ei ole ainoa keino pitää kasvinsyöjiä loitolla, vaan ne myös maistuvat pahoilta. Tutkijat Lee ym. kertovat artikkelissaan ruskeapääsilkkiapinoilla (*Callithrix flaviceps*) tehdystä tutkimuksesta, missä havaittiin eläinten syövän vain *Siparuna guianensis* lajin siemeniä välttellen kitkerää, alkaloidipitoista hedelmää. Watts ym. (2011) tutkimuksessa havaittiin, että tuliunikon (*Eschscholzia californica*) alkaloideja tuottamattoman variantin juuret tulivat todennäköisimmin taskurottien (Geomyidae) syömiksi. Tuliunikot, jotka tuottivat alkaloideja juuriinsa, säästyivät tutkimuksen mukaan herbivorialta.

Pahan maun lisäksi BIA-yhdisteet ovat haitallisia muille organismeille (Lee ym., 2013). Esimerkiksi ängelmien (*Thalictrum*) tuottama berberiini, joka kuuluu bentsyyli-isokinolisiin alkaloideihin, kertyy kasvin juuriin ja sillä on kasvinsyöjien ruokailua estäviä ominaisuuksia (eng. feeding deterrent). Myös oopiumunikon syntetisoima papaveriini toimii ruokailun estäjänä. Berberiini heikentää useiden hyönteisten toukkien, kuten esimerkiksi banaanikärpäsen (*Drosophila melanogaster*) ja lehtinunnan (*Lymantria dispar*), selviytymistä. Tämän vuoksi berberiiniä voisi

hyödyntää tuholaiсторjunnassa. Magnofloriini toimii myös ruokailun estäjänä. Tutkijat Morris ja Facchini (2016) kertovat artikkelissaan piippuköynnöksillä (*Aristolochia*) tehdystä tutkimuksesta. Tutkimuksessa todettiin piippuköynnösten kerryttävän magnofloriinia, kun *Battus polydamus*-perhosen toukat olivat ruokailleet kasvilla.

5.2 Bentsyyli-isokinolisten alkaloidien vaikutus mikrobeihin

Sanguinariini kertyy pääasiassa oopiumunikon juuriin (Singh ym., 2019). Varautuneet ammoniumkationit, joita löytyy esimerkiksi benzo[c]fenantridiineihin kuuluvasta sanguinariinista, puolustavat kasvia herbivoriaa sekä patogeenejä, kuten sieniä, bakteereja ja viruksia, vastaan (Lee ym., 2013). Sanguinariini inhiboi DNA-synteesiä, neurotransseptoreita sekä koliiniasetyylitransferaasia, joka vaikuttaa keskushermoston välittäjäaineiden toimintaan ja on siten haitallista niin mikrobeille kuin selkärangkaisillekin (Chaturvedi ym., 2013).

Myöskin aporfiinisten alkaloidien, kuten magnofloriinin, ajatellaan omaavan antimikrobiaalisia ominaisuuksia (Morris & Facchini, 2016). Ranunculales-suvun kasveilla magnofloriinia kertyy yleensä maanalaisiin kasvinosiiniin, kuten juuriin. Magnofloriini puolustaa kasveja patogeeneiltä, mutta myös haittaa muiden kilpailevien kasvien toimintaa, eli toimii allelopaattisena agenttina.

Oopiumunikon maitiaisnesteessä on morfiinia noin 5% (Chaturvedi ym., 2013). Tutkijat Lee ym. (Lee ym., 2013) kertovat artikkelissaan bismorfiinista, joka toimii soluseinän vahvistajana. Bismorfiini on morfiinin dimeeri, eli molekyyli koostuu kahdesta morfiiniyksiköstä. Kun oopiumunikon kosta altistuu mekaaniselle vauriolle tai patogeenien hyökkäykselle, kasvin syntetisoima morfiini hapettuu bismorfiiniksi (Morimoto ym., 2001). Bismorfiini sitoutuu soluseinän pektiineihin ionisidoksin, jonka ansiosta pektiinit ovat soluseinässä ristilinkittyneinä (eng. cross-linking), joka heikentää pektinaasien hydrolysoivaa eli hajottavaa vaikutusta. Bismorfiini siis lujittaa soluseinää ja siten kasvi puolustautuu esimerkiksi tiettyjen kasvipatogeenien erittämiltä soluseinää hajottavilta entsyymeiltä. Itse morfiinin merkitys oopiumunikossa on vielä selvittämättä (Hagel & Facchini, 2013).

6. Pohdinta

Oopiumunikko biosyntetisoi lukuisia eri rakenteellisiin alaryhmiin kuuluvia bentsyyli-isokinolisia alkaloideja, kuten morfiinisia alkaloideja, benzo[c]fenantridiinejä, ftalidi-isokinoleja,

protoberberiinejä, aporfiineja ja 1-bentsyyli-isokinoleja (Hagel & Facchini, 2013). Näistä alaryhmistä yleisimpiä alkaloideja kasvilla ovat morfiini, sanguinariini, noskapiini, magnofloriini ja papaveriini. Kaikki BIA:en biosynteesin välituotteena toimii (S)-norkoklauriini, joka muodostuu kahden L-tyrosiinijohdannaisen kondensaatioissa. Runsaimmat alkaloidit oopiumunikon maitiaisnesteessä ovat morfiini, kodeiini, ja tebaiini sekä noskapiini. Sytotoksista sanguinariinia ja sen pelkistynyttä, vähemmän myrkyllistä välituotetta dihydrosanguinariinia esiintyy eniten kasvin juuressa. Oopiumunikon tuottamat BIA:t ovat tärkeitä sekä taloudellisesti että lääketieteellisesti. Alkaloidien merkittävyyden takia biosynteesireitin ja siihen vaikuttavien eri tekijöiden tunteminen voisi mahdollistaa sekundäärimetaboliittien tehokkaan teollisen tuotannon.

Tietämys oopiumunikon BIA-biosynteesireitistä, sitä säätelevistä geeneistä ja muista tekijöistä on lisääntynyt viime vuosina. Kasvin genomin tutkiminen on johtanut uusien entsyymien löytymiseen. Näitä uusia entsyymejä ovat esimerkiksi (S)-retikuliinin epimerisaatiota (R)-retikuliiniksi katalysoiva retikuliiniepimeraasi (REPI) ja 3-O-asetyyli-papaveroksiinia syntetisoiva, heterodimeerinen OMT2:OMT3 tai OMT2:OMT6 (Park ym., 2018; Singh ym., 2019). Kasvin genomin analyyseissä on myös löydetty entsyymejä, jotka katalysoivat aiemmin spontaaneiksi miellettyjä reaktioita oopiumunikossa, kuten tebaiinisyntaasi ja morfinonin sekä kodeinonin synteesiä katalysoiva neopinoni-isomeraasi. Tämä herättääkin kysymyksen, että voisivatko muutkin reaktiot biosynteesireitillä, jotka nykyään katsotaan tapahtuvan spontaanisti, olla sittenkin entsyymaattisesti katalysoituja (Singh ym., 2019).

Vaikka BIA-yhdisteiden muodostuminen kasveissa on selvitetty yksityiskohtaisesti, biosynteesireitti muuttuu ja uutta tietoa voi löytyä jatkuvasti. Havainnollistetussa biosynteesireitissä on silti aukkoja, esimerkiksi dopamiinia ja 4-HFAA muodostumista katalysoivia entsyymejä ei vielä tunneta (Singh ym., 2019). Myös papaveriinin ja magnofloriinin biosynteesireitit ovat kiistanalaisia tänäkin päivänä. Papaveriinia kasvi biosyntetisoi joko NH-reitissä (S)-koklauriinin kautta, tai sitten NHC3-reitillä (S)-retikuliinin kautta, kuten muutkin tutkielmassa käsitellyistä alkaloideista (Desgagné-Penix & Facchini, 2012). Tutkimuksessa tehdyn viruksen indusoiman geeninhiljennyksen perusteella NH-reitti on todennäköisempi vaihtoehto papaveriinin biosynteesissä, mutta NHC3-reitti ei ole silti poissuljettu vaihtoehto. Magnofloriinin biosynteesissä taas välituotteet ja niitä katalysoivien entsyymien järjestys ovat epäselviä. Magnofloriinin lähtöaineena toimii (S)-retikuliini, mutta välituotteina voi olla joko tembetariini tai korytuberiini (Morris & Facchini, 2016).

Bentsyyli-isokinolisten alkaloidien biosynteesin säätely, alkaloidien kuljetus sekä itse lopputuotteiden ekofysiologinen merkitys oopiumunikossa ovat vielä osin selvittämättömiä. Biosynteesiä säätelevät miRNA:t, kasvihormonit, endofyytit sekä transkriptiofaktorit ovat osin tunnistettu, mutta tarkka säätelymekanismi on yhä selvittämättä. Näiden sekundäärimetaboliittien solunsisäistä kuljetusta on mallinnettu hypoteettisesti vain sanguinariinilla, ja magnofloriinin biosynteesin arvellaan mahdollisesti tapahtuvan solulimassa (Singh ym., 2019). Muiden alkaloidien biosynteesin tapahtumapaikka ja lopputuotteiden solunsisäinen kuljetus ovat edelleen selvittämättömiä mysteerejä. Oopiumunikon tuottamia terapeuttisia sekundäärimetaboliitteja on hyödynnetty vuosituhansien ajan, ja tutkittu tiiviisti yli vuosisadan, mutta näiden molekyylien vaikutukset ovat tutumpia ihmisillä kuin itse kasvilla. Adaptiivisten hyötyjen tuntemattomuudesta todistaa yksi lääketieteellisesti tärkein alkaloidi morfiini, jolla ei ole tunnettuja kasvin puolustukseen vaikuttavia hyötyjä, muita kuin toimia soluseinää vahvistavan bismorfiinin lähtöaineena (Morimoto ym., 2001). Berberiinillä, joka kuuluu bentsyyli-isokinolisiin alkaloideihin, on vaikutusta hyönteisten selviämiseen, ja sitä mahdollisesti voisi hyödyntää tuholaistorjunnassa (Lee ym., 2013). Alkaloidien vaikutusten tunteminen niin itse kasveissa kuin muissa eliöissä voisi avata oven myös muiden BIA-yhdisteiden käytölle maataloudessa. Kasvavan väestön tarve näitä alkaloidia kohtaan kasvaa, minkä vuoksi tulevaisuudessa bentsyyli-isokinolisten alkaloidien biosynteesin ja siihen vaikuttavien tekijöiden tunteminen on tärkeää, jotta alkaloidien tehokas tuotanto olisi mahdollista (Singh ym., 2019).

7. Lähteet

- Agrawal, A. A., & Konno, K. (2009). Latex: A model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 311–331. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ECOLSYS.110308.120307>
- Beaudoin, G. A. W., & Facchini, P. J. (2014). Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta*, 240(240), 19–32. <https://doi.org/10.1007/S00425-014-2056-8>
- Bird, D. A., & Facchini, P. J. (2001). Berberine bridge enzyme, a key branch-point enzyme in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis, contains a vacuolar sorting determinant. *Planta*, 213(6), 888–897. <https://doi.org/10.1007/S004250100582>

- Boke, H., Ozhuner, E., Turktas, M., Parmaksiz, I., Ozcan, S., & Unver, T. (2015). Regulation of the alkaloid biosynthesis by miRNA in opium poppy. *Plant Biotechnology Journal*, *13*(3), 409–420. <https://doi.org/10.1111/PBI.12346>
- Chaturvedi, N., Singh, S. K., Shukla, A. K., Lal, R. K., Gupta, M. M., Dwivedi, U. N., & Shasany, A. K. (2013). Latex-less opium poppy: cause for less latex and reduced peduncle strength. *Physiologia Plantarum*. <https://doi.org/10.1111/ppl.12086>
- Dastmalchi, M., Park, M. R., Morris, J. S., & Facchini, P. (2018). Family portraits: the enzymes behind benzyloquinoline alkaloid diversity. *Phytochemistry Reviews*, *17*(2), 249–277. <https://doi.org/10.1007/S11101-017-9519-Z>
- Desgagné-Penix, I., & Facchini, P. J. (2012). Systematic silencing of benzyloquinoline alkaloid biosynthetic genes reveals the major route to papaverine in opium poppy. *Plant Journal*, *72*(2), 331–344. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2012.05084.X>
- Dittbrenner, A., Mock, H.-P., Börner, A., & Lohwasser, U. (2009). Variability of alkaloid content in *Papaver somniferum* L. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, *82*, 103–107.
- Gurkok, T., Turktas, M., Parmaksiz, I., & Unver, T. (2015). Transcriptome Profiling of Alkaloid Biosynthesis in Elicitor Induced Opium Poppy. *Plant Molecular Biology Reporter*, *33*(3), 673–688. <https://doi.org/10.1007/S11105-014-0772-7>
- Hagel, J. M., & Facchini, P. J. (2013). Benzyloquinoline alkaloid metabolism: A century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*, *54*(5), 647–672. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCT020>
- Hagel, J. M., Yeung, E. C., & Facchini, P. J. (2008). Got milk? The secret life of laticifers. *Trends in Plant Science*, *13*(12), 631–639. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2008.09.005>
- Han, X., Lamshöft, M., Grobe, N., Ren, X., Fist, A. J., Kutchan, T. M., Spiteller, M., & Zenk, M. H. (2010). The biosynthesis of papaverine proceeds via (S)-reticuline. *Phytochemistry*, *71*(11–12), 1305–1312. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2010.04.022>
- Huang, F. C., & Kutchan, T. M. (2000). Distribution of morphinan and benzo[c]phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, *53*(5), 555–564. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00600-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00600-7)

- JS, M., & PJ, F. (2016). Isolation and Characterization of Reticuline N-Methyltransferase Involved in Biosynthesis of the Aporphine Alkaloid Magnoflorine in Opium Poppy. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(45), 23416–23427. <https://doi.org/10.1074/JBC.M116.750893>
- Kakeshpour, T., Nayebi, S., Rashidi Monfared, S., Moieni, A., & Karimzadeh, G. (2015). Identification and expression analyses of MYB and WRKY transcription factor genes in *Papaver somniferum* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 21(4), 465–478. <https://doi.org/10.1007/S12298-015-0325-Z>
- Khan, R., Masroor, M., Khan, A., Singh, M., Nasir, S., Naeem, M., Siddiqui, M. H., & Mohammad, F. (2007). Gibberellic acid and triacontanol can ameliorate the opium yield and morphine production in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, 57(4), 307–312. <https://doi.org/10.1080/09064710600982811>
- Lee, E. J., Hagel, J. M., & Facchini, P. J. (2013). Role of the phloem in the biochemistry and ecophysiology of benzyloisoquinoline alkaloid metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 4(JUN), 182. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2013.00182/BIBTEX>
- Liscombe, D. K., & Facchini, P. J. (2008). Evolutionary and cellular webs in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 173–180. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2008.02.012>
- Mahdavi-Damghani, A., Kamkar, B., Al-Ahmadi, M. J., Testi, L., Muñoz-Ledesma, F. J., & Villalobos, F. J. (2010). Water stress effects on growth, development and yield of opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Agricultural Water Management*, 97(10), 1582–1590. <https://doi.org/10.1016/J.AGWAT.2010.05.011>
- Morimoto, S., Suemori, K., Moriwaki, J., Taura, F., Tanaka, H., Aso, M., Tanaka, M., Suemune, H., Shimohigashi, Y., & Shoyama, Y. (2001). Morphine metabolism in the opium poppy and its possible physiological function. Biochemical characterization of the morphine metabolite, bismorphine. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 38179–38184. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107105200>
- Morris, J. S., & Facchini, P. J. (2016). Isolation and Characterization of Reticuline N-Methyltransferase Involved in Biosynthesis of the Aporphine Alkaloid Magnoflorine in Opium

Poppy * □ S. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 291(45), 23416–23427.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.750893>

Pandey, S. S., Singh, S., Babu, C. S. V., Shanker, K., Srivastava, N. K., & Kalra, A. (2016). Endophytes of opium poppy differentially modulate host plant productivity and genes for the biosynthetic pathway of benzyloquinoline alkaloids. *Planta*, 243(5), 1097–1114.

<https://doi.org/10.1007/s00425-016-2467-9>

Park, M. R., Chen, X., Lang, D. E., Ng, K. K. S., & Facchini, P. J. (2018). Heterodimeric O-methyltransferases involved in the biosynthesis of noscapine in opium poppy. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 95(2), 252–267. <https://doi.org/10.1111/tpj.13947>

Pienkny, S., Brandt, W., Schmidt, J., Kramell, R., & Ziegler, J. (2009). Functional characterization of a novel benzyloquinoline O-methyltransferase suggests its involvement in papaverine biosynthesis in opium poppy (*Papaver somniferum* L). *Plant Journal*, 60(1), 56–67.

<https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2009.03937.X>

Ray, T., Pandey, S. S., Pandey, A., Srivastava, M., Shanker, K., & Kalra, A. (2019). Endophytic Consortium with Diverse Gene-Regulating Capabilities of Benzyloquinoline Alkaloids Biosynthetic Pathway Can Enhance Endogenous Morphine Biosynthesis in *Papaver somniferum*. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00925>

Sabzehzari, M., & Naghavi, M. R. (2019). Phyto-miRNAs-based regulation of metabolites biosynthesis in medicinal plants. *Gene*, 682, 13–24.

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.09.049>

Singh, A., Menéndez-Perdomo, I. M., & Facchini, P. J. (2019). Benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy: an update. *Phytochemistry Reviews*, 18(6), 1457–1482.

<https://doi.org/10.1007/S11101-019-09644-W>

Watts, S. M., Dodson, C. D., & Reichman, O. J. (2011). The roots of defense: plant resistance and tolerance to belowground herbivory. *PloS One*, 6(4), e18463–e18463.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018463>

Weid, M., Rg Ziegler, J., & Kutchan, T. M. (2004). *The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, Papaver somniferum.*

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0405704101

Ziegler, J., Facchini, P. J., Geißler, R., Schmidt, J., Ammer, C., Kramell, R., Voigtländer, S., Gesell, A., Pienkny, S., & Brandt, W. (2009). Evolution of morphine biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry*, 70(15–16), 1696–1707. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2009.07.006>